

R因子の伝達阻害に関する研究

著者	鈴木 道子
号	348
発行年	1966
URL	http://hdl.handle.net/10097/18275

氏 名（本籍） ナズ 鈴 キ 木 ミチ 道 コ 子

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 3 4 8 号

学位授与年月日 昭 和 4 1 年 3 月 4 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

最 終 学 歴 昭和 3 0 年 3 月
東京女子医科大学卒業

学 位 論 文 題 目 R 因子の伝達阻害に関する研究

（ 主 査 ）

論文審査委員 教授 石 田 名香雄 教授 山 根 績

教授 村 上 次 男

論文内容要旨

1959年落合らと秋葉らとが独立に、赤痢菌の多剤耐性が混合培養により感受性大腸菌、赤痢菌に伝達されることを見出した。その後この伝達現象の機序は、一種のエビゾーム(R因子と呼ぶ)によつて運ばれることが明らかにされ、次いで此の伝達は蛋白あるいは核酸合成阻害剤、代謝阻害剤、表面活性剤等によつて阻止されることが報告された。しかし、これ等の報告の多くは伝達阻害の現象の観察に止まり、阻害作用の機序については検討して居ない。著者は細胞表面の活性に影響を及ぼすと考えられるカチオンを中心としてR因子伝達阻害物質をスクリーニングした結果、 Zn^{++} とくに $ZnSO_4$ がR因子の伝達を特異的に阻止することを見出したので其の作用機序について検討を加えた。

実験材料ならびに方法：伝達系として donor に Sh. flex. 2b 527 (SA に 1000 mcg/mg 以上, TC に 250 mcg/mg それぞれ耐性) を, recipient に E. Coli K-12 W1177 (SM に 500 mcg/mg 耐性) を用いたが, donor の TC 耐性がエビゾーム性である。donor と recipient の対数期バイオン培養を等量づつ混合し, 37°C に静置培養の後, 3種の選択培地に塗抹した。SA 加 Mueller-Hinton 培地には donor のみが生育し, TC および SM 加 BTB 培地には R 因子の伝達を受けて TC 耐性になつた recipient のみが生育でき, SM 加 BTB 培地には耐性化の有無に関係なく recipient が生育できる。伝達阻止効果を検べた物質は, KCN; KCl, NaCl; $MgCl_2$, $MnCl_2$, $ZnCl_2$, $Zn(CH_3COO)_2$, $ZnSO_4$; Colistin sulfate; Chloramphenicol; puromycin および mitomycin C であるが, いづれも混合培養開始と同時に水溶液として加えた。その際とくに pH の修正はおこなわなかつたが, 予備実験の成績から混合培養の pH 5.0 ~ 9.0 の範囲内では生菌数および R 因子の伝達頻度に差のないことが明らかである。阻害剤添加系の耐性伝達頻度が対照の 10^{-3} 以下に抑制されるような阻害剤の最低濃度を仮に最小伝達阻止濃度と呼び, 一方 donor および recipient に対する発育抑制(最小発育阻止濃度)を測り, 化学療法係数的な見地から両者の比を算出して各種阻害剤の阻害効果を比較した。

実験結果：1) 菌の発育を抑制せず R 因子の伝達を阻止できたもの、即ち最小発育阻止濃度と最小伝達阻止濃度との比が 1.0 以上であつたものは Zn 化合物だけであり, 最大値は $ZnSO_4$ の 4—8, 次いで $ZnCl_2$, $Zn(CH_3COO)_2$ が共に 1—2, 最小値は CM の

0.05—0.03 であつた。2) ZnSO_4 の最小伝達阻止濃度は 3×10^{-4} mo/l であるが、 $\frac{1}{2}$ の 1.5×10^{-4} mo/l では阻止効果は極めて弱く、2 倍の 6×10^{-4} mo/l では菌の発育抑制が強くあらわれた。3) 予め ZnSO_4 で前処理した菌同志で混合培養をおこなつたが、伝達は阻止されなかつた。4) 混合培養の経過中に ZnSO_4 を加えた場合、R 因子の伝達はその後から完全に停止した。5) ZnSO_4 により伝達が完全に阻止されている混合培養を新しいブイヨンに再懸濁するか乃至はそのまま等量の新鮮ブイオンを添加するだけで忽ち R 因子の伝達は再開された。6) ミキサー処理による接合中断直後に ZnSO_4 を加えた場合、添加直後に耐性化 recipient 数の可成りの減少がみられた。7) 耐性化 recipient の検出にあたり、TC・SM 加培地と TC・SM・ ZnSO_4 加培地とに同時に菌を塗抹して両平板上のコロニー数を比較したが、全く差を認めなかつた。8) 2b 527R (TC) と W1177 との混合培養の結果えられた W1177R (TC) を donor とし、K-12 (wild type) を recipient とした第 2 の伝達系に対しても ZnSO_4 は同じ濃度で同様の阻止効果を示した。

総括ならびに考按：R 因子の伝達阻害物質をスクリーニングした結果、テストに用いられた物質はすべて一見或る濃度で阻害作用を示したようであるが、菌の発育を抑制しない低濃度で伝達を完全に阻止できたものは ZnSO_4 唯一つである。 ZnSO_4 が伝達現象のどの段階に作用するかを明らかにすることは、用いた伝達系の伝達頻度が低かつたこと、短時間内に plateau に達しない反応系であることなどから困難であつた。しかし混合前単独処理で全く阻害効果を示さなかつたことは、acriflavine のようにエピゾームを除去するものではないと考える。donor と recipient の共存下ではじめて阻害効果を発揮し、添加直後から完全に伝達を阻止するが其の作用は可逆的である。また ZnSO_4 加培地上での形質発現阻害は認められない。これらの結果から推測して、 ZnSO_4 は R 因子伝達の可成り早期の段階；おそらくエピゾームの移行前で特異的対合形成を妨げるものと考ええる。またこれ等の結果は、T1 フレーズの E. Coli への irreversible adsorption が Zn^{++} により阻止される機序を明らかにした Puck らの成績と一致して興味深い。

結語：R 因子の伝達阻止物質をスクリーニングした結果、菌の発育を抑制しない低濃度で伝達を完全に阻止する唯一の物質として ZnSO_4 を見出した。 ZnSO_4 の伝達阻止作用の機序は、菌の特異的対合を妨げる結果によるものと考ええる。

審 査 結 果 の 要 旨

赤痢菌の多剤耐性はエピゾームの一種であるR因子によつて伝達される。この伝達を遺伝学的な概念としてではなく、物質論的に実証するため著者は伝達の運動速度論的解析を第一に行い、つづいて之を阻害する物質を求めて反応の律速物質を解明することを企てた。

その結果多くのZn化合物、就中 ZnSO_4 がR因子の伝達を阻害することを見出した。第一の発見である。第二の発見は何時 ZnSO_4 を加えれば反応は阻止されるかという時期の発見である。予め両菌の接触以前に与えておいても何の効果もないし、もし両菌が接触している最中であれば ZnSO_4 の添加は直ちに反応の停止として現われる。しかも希釈により ZnSO_4 を有効量以下に下げると阻止効果は直ちに恢復してしまう。即ち反応は可逆的である。また別の実験で ZnSO_4 を添加した寒天培地でepisome transferの結果に基く形質発現が阻害されるか否かしらべると、全くこの様な効果は ZnSO_4 によつて示されない事が判つた。その他 ZnSO_4 を経時的に除去する実験の解析からも ZnSO_4 はR因子伝達のかなり早期の段階、おそらくは特異的結合(specific pairing)を妨げるものと推論した。 ZnSO_4 にはAcriflavineの様なepisome除去作用はない。以上 ZnSO_4 によるR因子伝達の阻害の発見、その作用機作の解明など本論文は学位に値するものと認める。